第 37 卷第 8 期
2017 年 4 月
生　态　学　报
ACTA ECOLOGICA SINICA
Vol.37,No.8
Apr.,2017

DOI: 10.5846/stxb201511162317
王雪芹, 王光华, 乔飞, 高其康, Kong Luen HEONG, 祝增荣, 程家安.高通量测序及其在食物网解析中的应用进展.生态学报,2017,37(8):2530-2539.
Wang X Q, Wang G H, Qiao F, Gao Q K, Kong Luen HEONG, Zhu Z R, Cheng J A.Progress on high-throughput sequencing and its applications in food web analysis.Acta Ecologica Sinica,2017,37(8):2530-2539.

高通量测序及其在食物网解析中的应用进展

王雪芹[1,2], 王光华[1,2], 乔　飞[1,2], 高其康[2,3], Kong Luen HEONG[1,2], 祝增荣[1,2], 程家安[1,2,*]

1 浙江大学水稻生物学国家重点实验室, 杭州　310058
2 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州　310058
3 浙江大学农生环学部分析测试中心, 杭州　310058

摘要: 高通量测序是 DNA 测序技术发展中的重大突破,它的出现为现代生物科学研究提供了前所未有的机遇,例如基于猎物和寄主植物 DNA 分子解析生态系统的食物网研究已逐渐成为捕食性动物与植食性动物食物网研究的新型模式。在简要总结 Roche 454、Illumina 和 Ion Torrent 为代表的第二代测序技术的原理及最新进展的基础上,综述了近年来利用高通量测序技术在捕食性和植食性动物食物网解析构建研究方面取得的最新进展及存在的问题,以期为探索捕食性和植食性动物的猎物/寄主范围、猎物/寄主转换、资源分配、生物防治、生物保护和生态恢复新方法提供思路和启发。

关键词: 第二代测序;捕食/植食性动物;营养关系;食物转换;宏条形码技术

Progress on high-throughput sequencing and its applications in food web analysis

WANG Xueqin[1,2], WANG Guanghua[1,2], QIAO Fei[1,2], GAO Qikang[2,3], Kong Luen HEONG[1,2], ZHU Zengrong[1,2], CHENG Jiaan[1,2,*]

1 *State Key Laboratory of Rice Biology, Zhejiang University, Hangzhou* 310058, *China*
2 *Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou* 310058, *China*
3 *Analysis Center of Agrobiology and Environmental Sciences, Zhejiang University, Hangzhou* 310058, *China*

Abstract: High-throughput sequencing is a major breakthrough in the development of DNA sequencing technology and provides an unprecedented opportunity for modern biological scientific research, such as the DNA-based approach tracking the food chains among predators-prey or herbivores-host plants trophic interactions in ecosystems. This review illustrates and compares the principles of various types of technology, including the Roche 454, Illumina, and Ion Torrent technologies, and other recent progress. We also summarize studies that have used high-throughput sequencing technology to study interactions among generalist predators/herbivores and their prey/hosts. This review could provide new information and novel approaches to exploring molecular trophic interactions and improving our understanding of the prey/host spectrum, prey/host shift, biological control, resource allocation, conservation biology, and ecological restoration.

Key Words: next generation sequencing; generalist predator; generalist herbivore; trophic interactions; diet switching; metabarcoding

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD19B01);浙江省自然科学基金项目(LY16C140002);科技部国家"973"基础重点研究发展规划项目(2010CB126200)

收稿日期: 2015-11-16;　　**网络出版日期:** 2016-10-29

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: jacheng@ zju.edu.cn

1970 年代中期,英国生物化学家 Sanger 发明了 Sanger 测序法(双脱氧核苷酸末端终止法),为科研人员开启了深入研究生命遗传密码的大门,Sanger 也因此获得 1980 年的诺贝尔化学奖[1-2]。自 1977 年以 Sanger 法为代表的第一代测序技术帮助人们完成了第一个完整基因组图谱的绘制以来,测序技术不断发展进步。进入 21 世纪后,以 Roche 454、Illumina 和 Ion Torrent 等测序系统为代表的第二代测序技术诞生,使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能[3]。第二代测序技术又称高通量测序技术(High Throughput Sequencing, HTS),下一代测序技术(Next Generation Sequencing, NGS),它能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,具有测序通量高、速度快及成本低等优点,是 DNA 测序发展历程的一个里程碑,使人们进入了基因组和后基因组时代[4],为现代生命科学研究提供了前所未有的机遇。

基于高通量测序技术获得生物特异性基因识别 DNA 条形码序列的扩增子测序方法,称为 DNA 宏条形码技术(DNA Metabarcoding)。该技术可将整个混合样本的 DNA 片段扩增后再进行高通量测序,进而确定取样环境中生物的分布状况,目前已用于微生物和动物等环境 DNA (Environmental DNA, eDNA) 科学方面的研究[5-6]。DNA 宏条形码技术具有快速、灵敏、可重复、高效及省时省力等优点,不仅为生物多样性调查提供了高效有力的方法,而且在环境监测、资源管理和生态评估等方面具有重要的意义[7-10]。

食物网是生物群落内各物种之间营养关系的基本联系,反映了自然界各种生物之间相互依存、相互制约、协同进化等互作关系的自然属性,其研究结果可直接体现生态群落的功能结构,因此物种间食物网的研究始终是生态学中非常重要和活跃的研究领域[11]。近年来,基于 DNA 宏条形码技术分子解析构建捕食者-猎物和植食者-植物营养关系研究发展迅速,并逐渐成为食物网研究的新型模式[12],高通量测序的出现为研究捕食性和植食性动物复杂的食物网提供了前所未有的机遇[13]。本文在简要总结以 Roche 454、Illumina 和 Ion Torrent 为代表的高通量测序技术原理及最新进展的基础上,综述了近年来基于高通量测序的 DNA 宏条形码技术在食物网解析构建方面的应用现状和发展前景,以期为探索捕食/植食性动物的猎物/寄主范围、猎物/寄主转换、资源分配、生物防治、生物保护和生态恢复新方法提供思路和启发。

1　高通量测序技术原理及发展

第二代测序技术以高通量低成本为其主要特征,并在此基础上保持了第一代测序技术的高准确性。第二代测序技术主要包括基于合成测序(Sequencing by synthesis, SBS)的 Roche 454,Illumina 和 Ion Torrent 测序技术[3, 14-16]。

1.1　Roche 454 测序技术原理

2005 年,454 生命科学公司生产了第一台商品化的高通量测序仪-基因组测序 20[17]。454 测序仪利用焦磷酸法测序(Pyrosequencing),其原理是:首先将长度合适的单链 DNA 片段连接测序接头和模板接头制备成样品文库(图 1A 中文库制备)。将固化引物的磁珠与样品文库制成"一个磁珠=一个 DNA 片段"的微反应器,进行多轮油包水乳滴 PCR(emulsion PCR,emPCR)后,每个磁珠表面都结合了数千个相同的 DNA 拷贝,形成"一个磁珠=一个读长序列"(图 1A 中模板制备)。然后富集磁珠到微孔板上,每个微孔容纳一个磁珠,微孔板为流通池的一部分,其中一面通过测序反应的化合物,另一面则与 CCD 光学检测系统的光纤相接触。碱基测定采用边合成边测序,利用 ATP 硫酰化酶和荧光素酶在三磷酸核苷结合到 DNA 链上释放焦磷酸基团(PPi)光信号(图 1A 中测序技术)。顺次向流通池中加入 4 种 dNTP 中的一种,通过每个微孔之中释放的光信号确定 DNA 模板上的互补碱基,从而实现对 DNA 片段的准确快速测定[18]。目前 454 技术平台读取长度达到 600—1000bp,使得后继的序列拼接工作更加高效、准确,但测序通量相对较低和成本较高是其发展的瓶颈(表 1)。近年来,随着测序技术的发展,后来上市的测序仪(如 Illumina 的 MiSeq 和 Life Technologies 的 Ion Torrent 系统)更是将 454 仪器排挤到研究边缘,因此罗氏关闭了 454 义务,联合 PacBio 公司发展第三代测序技术[19]。

1.2　Illumina 测序技术原理

Illumina 公司的 Genome Analyzer 于 2006 年问世。首先把待测序列打断成 200—500 bp 的小片段,两端加

上不同的接头,连接载体,构建单链 DNA 文库(图 1B 中文库制备)。DNA 转移到表面固定有很多接头的 8 泳道微纤维板组成的流动槽,向反应体系中添加核苷酸和酶,进行桥式 PCR (Bridge PCR)。Bridge PCR 以流动槽表面固定的接头为模板,将桥型单链 DNA 扩增成桥型双链 DNA,经过不断的变性扩增循环,每种单链 DNA 都在各自的位置产生约 2000 个分子的高密度 DNA 簇(图 1B 中模板制备)。DNA 簇在 Genome Analyzer 综合分析仪上进行序列分析。向反应体系中同时添加 DNA 聚合酶、接头引物和带有碱基特异荧光标记的 4 种 dNTP。由于这些 dNTP 的 3′羟基被化学方法保护,因而每轮合成反应都只能添加 1 个 dNTP。在 dNTP 被添加到合成链上后,未使用的游离 dNTP 和 DNA 聚合酶会被洗脱。加入激发荧光缓冲液,用光学设备记录激光激发的荧光信号,再通过计算机分析转化为测序结果。信号记录完成后,加入化学试剂淬灭荧光信号并去除 dNTP 的 3′羟基保护基团,进行下一轮测序反应(图 1B 中测序技术)[16]。目前 Illumina 最新的测序平台的读取长度可以达到 2×150 bp(Hiseq 4000),2×300 bp(Miseq300),通量高和成本较低是其占据市场的优势(表 1)。

1.3 Ion Torrent 测序技术原理

Ion Torrent 测序原理是在半导体芯片的微孔中固定纳米尺度的连接 100 万条相同 DNA 片段的磁珠(Ion Sphere™)形成微型反应池(图 1C 中模板制备),随后依次掺入 ACGT。随着每个碱基的掺入,释放出氢离子,改变反应溶液的 pH 值,离子传感器检测到 pH 变化后,实时判读碱基,即刻从化学信息转变为数字电子信息(图 1C 中测序技术)[20]。这种方法直接检测 DNA 的合成,少了 CCD 扫描,荧光激发等环节,大大缩短了运行时间。这种技术跟芯片连接在一起,使得生物学和计算机学完全融为一体,创造了技术上的革新。

Ion Torrent 测序平台有 Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine)和 Ion Proton 两种测序仪。PGM 有 3 种芯片可供选择,Ion Proton 目前仅有 PI 芯片。芯片技术的发展使测序仪 2 h 碱基产量从 10 Mb 提升到 10 Gb。伴随着试剂的优化和测序通量的提高,Ion Torrent 读取长度也从 2011 年的 200 bp 提升到目前的 400 bp。不断提高的芯片密度、读取长度和优化的数据处理方式,将使 Ion Torrent 的测序通量在不久的将来进一步提高(表 1)[21-22]。

表 1 Roche 454 、Illumina 和 Ion Torrent 常用高通量测序平台主要技术参数和测序通量

Table 1 Technological and data output specifications of Roche 454, Illumina and Ion Torrent NGS platforms

公司 Company	平台 Platform	模板制备 Template preparation	测序方法 Sequencing chemistry	错误类型 Error type	运行时间 Run time	数据量 Throughput
Roche	454 GS Junior	微磁珠乳滴 PCR	焦磷酸测序法	插入缺失	10h	35MB
	454 FLX Titanium				10h	450MB
	454 FLX+				23h	700MB
Illumina	Illumina GAIIx	流动槽桥式 PCR	可逆终止子合成测序法	替换	6d	1T
	Illumina Hiseq 2500				6d	1T
	Illumina Hiseq 4000				3.5d	1.5T
	Illumina Miseq				2.5d	15G
Ion Torrent	Ion PGM (316 Chip)	微磁珠乳滴 PCR	半导体化学合成测序法	替换	4.9h	600MB
	Ion PGM (318 Chip)				7.3h	2G
	Ion Proton (PI Chip)				4h	10G

1.4 第三代测序技术

Roche 454、Illumina 和 Ion Torrent 为代表的这些平台原理各有不同,在通量、读长、准确度、速度和成本方面各具优势,目前已经广泛地应用于各项研究领域,并且在测序市场占有绝对优势地位。但是,近年来基于单个分子信号检测的单分子测序 (Single Molecule Sequencing, SMS),或第三代测序 (Third Generation Sequencing, TGS)技术发展快速,这些新技术包括 PacBio 的单分子实时测序(Single Molecule Real-time Sequencing, SMRT),Helicos 的真正单分子测序(True Single Molecule Sequencing, tSMS)和 Oxford 的纳米孔测

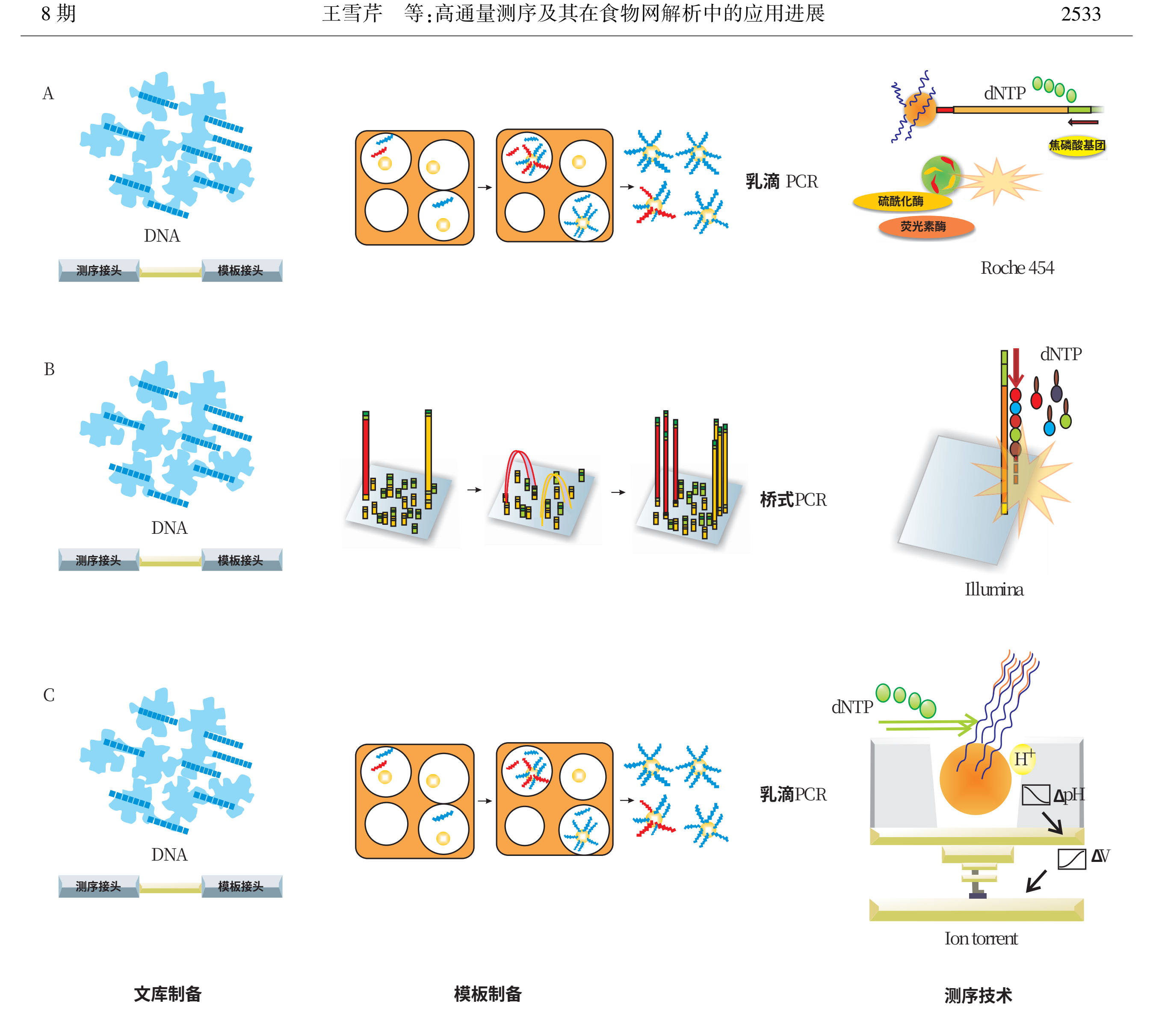


图 1　Roche 454 (A)、Illumina (B)和 Ion Torrent (C)3 种常用高通量测序平台工作原理比较图(改编自 Del Chierico 等[23])

Fig.1　Comparison of principle schemes from library preparation to sequencing technology among Roche 454 (A), Illumina (B) and Ion Torrent (C) (Modified from Del Chierico *et al.*[23])

序(Nanopore Sequencing)等[24]。

2　高通量测序在食物网研究中的应用

生态学是探索生物与环境关系的学科,而特定生态系统中物种间的食物联系,或食物网常是生态学研究的重点之一。数十年来,国际上植物-植食性生物-捕食性生物的食物网研究方法主要分为三大类,即传统方法(野外人工或摄像观察法、田间笼罩法、消化道内容物解剖分析法),生化方法(脂肪酸分析法、稳定同位素技术、蛋白质电泳分析法)和现代分子方法(多克隆抗体和单克隆抗体技术、DNA 分子技术),这些方法针对不同环境和研究对象各有其优缺点[25-26]。传统方法直观快速、可信度高,适用简单环境下大型动物的取食,不足之处是耗时耗力,具有偶然性;生化分析方法相对简便、效率高,适用于多种生态系统,缺点是不同生物之间成分的组成和重合、样品的处理方式等都会影响准确评估摄食信息;猎物蛋白抗体技术相对比较准确、甚至可以制作特定发育阶段的单克隆抗体,适合研究某种或几种特定猎物的捕食者,劣势之处是抗体制备繁琐、需要特殊细胞和组织培养系统,耗时长,成本高。近来,随着物种分子鉴定技术的发展和 NCBI、BOLD 等数据库的丰富完善,DNA 分子追踪食物链和食物网正成为分子生态学营养关系研究的主流方法[26]。

基于高通量测序的 DNA metabarcoding 分子解析食物方法不受猎物种类限制,尤其适合研究陆地和海洋等自然生态系统中具有不同生物学和生态学特性的广食性动物不同时空条件下的复杂食物网结构、时空转换和食物资源分配等。目前,该方法已广泛应用于捕食者-猎物和植食者-寄主植物食物链研究,进而可以组合开展食物网的研究,如基于消化道内容物或粪便 DNA 研究动物的食性以及在生态系统中的作用[6, 27-28]。该技术不仅可以通过计算测序产生序列的种类数定性和比较不同食物序列的相对丰度定量分析食物网内不同物种之间的关系[29-31],而且可以分析不同时空尺度下的食物网结构特征和食物转换,以解决生态学、生物进化、生物保护和种群群落构建恢复等方面的问题[6, 28]。例如,高通量测序通过对不同广食性捕食者或植食者样品消化道内容物或粪便样品进行 PCR 扩增时在引物的 5′末端加上由不同碱基组成的多重识别标签(Multiplex Identifier Sequences, MIDs),就能在一次测序中对不同来源,不同种类的广食性动物的各种猎物残留或寄主植物目标序列进行测序分析,既节约了时间、人力和物力,又避免了污染,具有简便、快速和信息量大等特点[13,32]。分子生态学杂志在 2014 年 8 月出版了专刊,对该技术的研究和分析方法以及应用领域进行了广泛的讨论[28]。

2.1 捕食性脊椎动物

Deagle 等[33]通过 Roche GS-FLX 平台研究了澳大利亚塔斯马尼亚岛 3 个不同海域的南非海狗 *Arctocephalus pusillus doriferus* 的 270 份粪便样本,结果显示南非海狗的主要猎物为新西兰红珍珠鱼 *Emmelichthys nitidus* 和青背竹筴鱼 *Trachurus declivis*,并且发现以前不被重视的澳洲鲭 *Scomber australasicus* 也是其重要猎物,这是宏条形码技术在捕食性动物食物网研究中的第一次应用,从而使得对大规模的野生动物的食物组成的研究成为可能。

本土珍稀物种的保护和培育甚至迁地保护是生物保护的重要内容。Brown 等[34]通过 Roche 454 测序研究毛里求斯马埃堡自然保护区本土珍稀物种蜥蜴 *Leiolopisma telfairii* 和入侵鼩鼱 *Suncus Murinus* 的猎物谱及资源分配,结果表明尽管两种捕食者不存在种间捕食,但食物网分析和 Pianka 生态位重叠指数表明这两种捕食者存在很高程度的猎物重叠和较强的猎物资源竞争,清除外来入侵的鼩鼱应是保护蜥蜴的首要措施。

蝙蝠是许多农林及卫生害虫的天敌,也是种子的传播者和花粉的传授者,在生态系统占据独特的生存空间,因此研究和保护蝙蝠在维护生态环境中具有十分重要的意义。Clare 等[35]基于 Ion Torrent PGM 测序平台,结合 316 芯片研究了加拿大安大略省剑桥市郊森林斑块大棕蝠 *Eptesicus fuscus* 不同时间猎物的多样性及猎物转换,表明大棕蝠对甲虫捕食率最高,其猎物谱中鳞翅目具有最高的多样性,猎物种类组成在不同年份和季节变化很大,但鳞翅目和蜉蝣目是其恒定的猎物成分,猎物多样性随着昆虫多样性的减少而增加。这说明当猎物资源有限时,大棕蝠可以改变摄食策略以维持其生态稳定性。

2.2 植食性脊椎动物

海岛为许多濒危鸟类提供了栖息环境,但是对外来物种可能是脆弱的生态系统。Ando 等[36]通过扩增植物叶绿体 tRNA L(*trnL*)基因条形码结合 Roche 454 焦磷酸测序研究了日本小笠原诸岛濒危黑林鸽 *Columba janthina nitens* 在不同岛屿和不同时间的食物谱及食物转换,结果发现黑林鸽更喜欢取食外来植物,因此建议在清除外来植物和保护本岛植物之间应该有个权衡,以保持黑林鸽的食物资源。

人类活动造成的森林景观碎片化极大地影响了灵长类动物的栖息。Quéméré 等[37]利用 Illumina Genome Analyzer IIx 平台结合 metabarcoding 技术对马达加斯加岛达赖纳地区濒临灭绝的金冠冕狐猴 *Propithecus tattersalli* 的食性进行研究,发现金冠冕狐猴的食谱里至少有 130 种植物,并且在森林边缘生活的金冠冕狐猴食物中发现许多栽培和野生的植物种类,表明多样性的食谱有利于狐猴灵活改变食物结构应对栖息地的改变和环境的变化。

Kartzinel 等[30]通过 Illumina HiSeq 2500 平台结合 DNA Metabarcoding 技术,应用相对读长丰度(Relative Read Abundance, RRA)比较研究了肯尼亚南部非洲热带稀树草原艮氏小羚 *Madoqua guentheri*,非洲象 *Loxodonta africana*,平原斑马 *Equus quagga*,细纹斑马 *Equus grevyi*,非洲水牛 *Syncerus caffer*,瘤牛 *Bos indicus* 和

高角羚 *Aepyceros melampus* 等 7 种大型食草动物的食谱宽度、组成和重叠度。研究表明,食草的两种斑马食物中 99%以上的序列都是禾本科植物,而食嫩叶的艮氏小羚食物中禾本科植物却不足 1%,同一种食草动物食物谱相似,而不同种食草动物具有更加分化的食物谱,因此植物种类的多样性为维持非洲草原食物谱分化的大型食草动物的多样性奠定了基础。

2.3　捕食性无脊椎动物

Boyer 等[38]应用 Roche 454 焦磷酸测序技术结合蚯蚓的组特异性引物研究了 46 头濒危的软体动物蜗牛 *Powelliphanta augusta* 捕食蚯蚓的食物谱,分析了蜗牛与不同生物学特性蚯蚓的生态联系,并提出了保护迁移蜗牛的建议。

评价农业生态系统中捕食性天敌对害虫的控制作用是生态学研究的重要课题,也是实施害虫综合治理防治策略的基础。研究农业生态系统内某种捕食者是否影响目标猎物的种群动态,并不能仅仅简单地通过捕食者的捕食率来计算。Piñol 等[39]通过 Ion Torrent PGM 测序平台研究了英国燕麦田皿蛛 *Oedothorax fuscus* 的猎物谱,高通量测序生成 200 万条读长,去掉无效和捕食者本身读长,剩下 6 万多条有效读长,有效读长中比较丰富的是弹尾目、鳞翅目、双翅目和线虫的序列,也包含了蚜虫和集团内捕食(Intraguild Predation, IGP)而残留的蜘蛛的序列。结果表明,广食性天敌皿蛛 *O. fuscus* 具有宽广的猎物谱。

通过提高种植园植物多样性,为广食性捕食者提供替代猎物,以增加捕食者的密度来增强天敌对农业害虫的自然调控作用,是生态调控农业生产的重要组成部分。Mollot 等[40]基于构建香蕉园节肢动物 mini-barcodes 数据库和 Roche 454 高通量测序平台,通过建立种植牧草伏生臂形草 *Brachiaria decumbens* 的香蕉园和对照园比较的方式,比较了两种类型实验田捕食性天敌的猎物选择及对主要害虫香蕉象甲 *Cosmopolites sordidus* 控制作用。结果表明因为广食性捕食者转向捕食替换猎物,香蕉园种植牧草对天敌调控害虫种群可能有负作用。

2.4　植食性无脊椎动物

Valentini 等[41]设计了扩增植物叶绿体 tRNA L(*trnL*)基因条形码的通用引物,结合 Roche 454 测序研究了异色雏蝗 *Chorthippus biguttulus*,北京棒角蝗 *Gomphocerippus rufus*,智利螺旋蜗牛 *Helix aspersa*,鼻涕虫 *Deroceras reticulatum* 和 *Arion ater* 等动物的 36 份粪便样品,解析了这些植食性动物的食物谱,结果表明大约 50%的植物可以鉴定到种,这也是宏条形码技术在植食性动物食物研究中的第一次应用,为研究植食性动物食物谱和资源分配提供了切实可行的方法。

Kajtoch[42]通过 ABI Sanger 测序和高通量测序平台 Illumina MiSeq 解析了波兰中南部、波兰北部、乌克兰西部和斯洛伐克-摩拉维亚地区四个地理种群干热象甲 *Centricnemus leucogrammus* 寄主植物的 *rbcL*(1,5-二磷酸核酮糖羧化酶的大亚基基因)和 *trnL* 两种基因的条形码,比较了这两种测序技术对基于 *rbcL* 和 *trnL* 两种基因条形码的寄主植物解析深度,并分析了这 4 个地理种群的寄主植物范围。研究表明 Illumina 高通量测序比 Sanger 传统测序具有更详尽的解析度;并且,基于 *rbcL* 和 *trnL* 双基因条形码系统能为研究植食者的寄主植物(至少鉴定到属)提供足够的信息;4 个不同地理种群的干热象甲食物谱并不相同,这可能反应了干热象甲的地理种群的生态适应和遗传隔离,为保护稀有和濒危物种提供了借鉴。

研究直翅目昆虫单食性到广食性的宽广食物谱有助于我们探究植食性昆虫食性的分化和进化。通常认为蝗科的北方绿带蝗 *Chortophaga viridifasciata* 是禾草性植食者,赤腿蝗 *Melanoplus femurrubrum* 是杂草性植食者,而黑带双蝗 *Melanoplus bivittatus* 和卡罗来纳蝗 *Dissosteira carolina* 是混合性植食者。McClenaghan 等[43]基于 Illumina MiSeq 平台通过扩增野外采集的这 4 种蝗虫的消化道内容物的 *rbcL* 基因,运用 DNA metabarcoding 技术研究了这四种蝗虫的食性。结果证实黑带双蝗和卡罗来纳蝗是混合性植食者,北方绿带蝗是禾草性植食者,而赤腿蝗消化道内既有杂草也有禾本科植物,揭示了这些蝗虫种间存在食物资源竞争。

3 总结与展望

3.1 存在的问题

尽管近年来基于高通量测序技术的 DNA metabarcoding 技术解决了全面分析捕食者/植食者食物链和食物网的技术障碍,从而发展成为分子生态学研究中一个十分活跃的领域,但是其结果的可靠性仍受多方面因素的影响:

(1) 目的基因的选择 细胞内多拷贝的动物线粒体基因组和植物叶绿体基因组具有保守的结构和大小,因此适合作为动物分子鉴定和植物分子鉴定的标记[44-45]。但是,动物体的线粒体基因组转移至细胞核的线粒体假基因(Nuclear Mitochondrial-like Sequences, NUMTs)、内共生菌干扰、线粒体 DNA 的多态性和异质性可影响物种的鉴定和系统发育的构建[46-47]。

(2) 基因区域的选择 动物线粒体基因组 DNA 主要选择在 COI,16S 等区域,而 COI 的 658bp 长的 DNA 条形码(DNA Barcoding)区域是动物分类鉴定最常用的区域[48-49],也具有包括 NCBI 和 BOLD (www.boldsystems.org)等丰富的数据库资源[50],但 COI 基因进化速率的差异使其在一些类群中缺乏鉴定能力,因此有时需要多基因条形码鉴定系统[51]。同时,植物叶绿体 DNA 主要选择在 *rbcL*,*matK*(叶绿体赖氨酸基因(*trnK*)的内含子),*trnH-psbA* 3 个条形码片段及近来发现的植物核糖体 ITS 条形码片段,同样对于困难类群,很多学者建议使用多个条形码协同鉴定[52-53]。

(3) 引物的选择和评估 由于消化道残留或粪便是降解的短片段 DNA,因此 metabarcoding 分析其多样性时常用兼并的扩增短片段的通用引物,而通用引物的选择或组合、扩增偏向性、扩增成功率和扩增片段的分辨率等都会导致稀有的或者难扩增物种的数据丢失或失真等错误,从而影响到对捕食者和植食者与其食物间数量关系的解析,因而尚需在进一步明确这些因素与扩增效率关系的基础上完善食物网关系的定量分析方法[13, 54-55]。

(4) 阻止扩增捕食者本身的特异性阻断引物(Blocking primers)的使用 研究未解剖小型捕食性节肢动物的猎物时,未添加阻断引物的情况下,会产生大量捕食者本身的序列,有时即使在阻断引物存在的情况下,也未必能保证阻止成功[39, 56-57]。

(5) 公共数据平台 DNA 条形码参考数据库的不尽完善 生物 DNA 条形码是建立在物种形态分类基础上的分子鉴定,生物形态特征的可塑性和遗传多样性直接影响基于传统形态分类的生物鉴定,而当前训练有素的分类学家越来越少,形态分类学工作又不可避免地会遇到人为的错误及其他无法克服的困难,因此形态分类和系统分类的发展研究水平将直接影响物种的传统分类鉴定,进而影响其构建物种 DNA 条形码标准数据库、物种信息库、信息共享和应用[58-59]。

(6) 生物信息学专家和人才的短缺 高通量测序技术产生的海量数据的整合和分析在生物研究中发挥着关键作用,而动物食物网海量数据的分子解析不仅需要前期生态学、分类学工作者的基础工作,更需要后期生物信息学工作者的储存、检索、处理和分析以揭示大量而复杂的生物数据所赋有的生态学奥秘[60]。

3.2 展望

从复杂的野外观察、摄像到室内的消化道内容物解剖分析,从脂肪酸、同位素标记的生化分析到猎物蛋白特异的抗体技术,从普通 PCR、定量 PCR 再到基于高通量测序的宏条形码技术,捕食性和植食性动物的食物链和食物网研究发展的每一步都离不开科学的发展和技术的创新[12-13, 25, 61-62]。尽管基于高通量测序数据的 metabarcoding 方法还存在一些问题,如扩增区域的选择、引物的选择或组合、PCR 的偏好性、扩增效率的差异、读长的清晰度或解析度和数据库的完善度等[63-65],但随着高通量测序技术的发展和不断完善,尤其是测序通量的增加、读长的增长、信息储备量的增大、测序成本的降低、数据分析软件的优化以及生物条形码的发展和基因数据库资源的丰富[3, 66-67],特别是近年来发展的无偏见精确定量的 PCR-free 深度鸟枪法测序(Shotgun Sequencing)[68-71]和线粒体捕获富集深度测序多样性评估技术[72-73],都将为高通量、准确、快速和低成本的

全面深入研究捕食性和植食性动物的食物网提供更理想的资源和平台,为进一步应用高通量测序探索捕食性和植食性动物的猎物/寄主范围、猎物/寄主转换、生物防治、资源分配、生物保护、生态工程等生态恢复提供技术支撑和理论基础[27-28, 30]。

参考文献(References):

[1] Sanger F, Air G M, Barrell B G, Brown N L, Coulson A R, Fiddes J C, Hutchison III C A, Slocombe P M, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA. Nature, 1977, 265(5596): 687-695.

[2] Sanger F. Sequences, sequences, and sequences. Annual Review of Biochemistry, 1988, 57: 1-28.

[3] Glenn T C. Field guide to next-generation DNA sequencers. Molecular Ecology Resources, 2011, 11(5): 759-769.

[4] Pan Q, Shai O, Lee L J, Frey B J, Blencowe B J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. Nature Genetics, 2008, 40(12): 1413-1415.

[5] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg L H. Environmental DNA. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1789-1793.

[6] Bohmann K, Evans A, Gilbert M T P, Carvalho G R, Creer S, Knapp M, Yu D W, de Bruyn M. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. Trends in Ecology & Evolution, 2014, 29(6): 358-367.

[7] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 2045-2050.

[8] Yu D W, Ji Y Q, Emerson B C, Wang X Y, Ye C X, Yang C Y, Ding Z L. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. Methods in Ecology and Evolution, 2012, 3(4): 613-623.

[9] Ji Y Q, Ashton L, Pedley S M, Edwards D P, Tang Y, Nakamura A, Kitching R, Dolman P M, Woodcock P, Edwards F A, Larsen T H, Hsu W W, Benedick S, Hamer K C, Wilcove D S, Bruce C, Wang X Y, Levi T, Lott M, Emerson B C, Yu D W. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. Ecology Letters, 2013, 16(10): 1245-1257.

[10] 罗亚皇, 刘杰, 高连明, 李德铢. DNA 条形码在生态学研究中的应用与展望. 植物分类与资源学报, 2013, 35(6): 761-768.

[11] Rossberg A G. Food Webs and Biodiversity: Foundations, Models, Data. UK: Wiley Blackwell, 2013.

[12] King R A, Read D S, Traugott M, Symondson W O C. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. Molecular Ecology, 2008, 17(4): 947-963.

[13] Pompanon F, Deagle B E, Symondson W O C, Brown D S, Jarman S N, Taberlet P. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1931-1950.

[14] Seo T S, Bai X P, Kim D H, Meng Q L, Shi S D, Ruparel H, Li Z M, Turro N J, Ju J Y. Four-color DNA sequencing by synthesis on a chip using photocleavable fluorescent nucleotides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(17): 5926-5931.

[15] 闫绍鹏, 杨瑞华, 冷淑娇, 王秋玉, 周容涛. 高通量测序技术及其在农业科学研究中的应用. 中国农学通报, 2012, 28(30): 171-176.

[16] Morey M, Fernández-Marmiesse A, Castiñeiras D, Fraga J M, Couce M L, Cocho J A. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. Molecular Genetics and Metabolism, 2013, 110(1/2): 3-24.

[17] Margulies M, Egholm M, Altman W E, Attiya S, Bader J S, Bemben L A, Berka J, Braverman M S, Chen Y J, Chen Z T, Dewell S B, Du L, Fierro J M, Forte R, Gomes X V, Godwin B C, He W, Helgesen S, Ho C H, Hutchison S K, Irzyk G P, Jando S C, Alenquer M L I, Jarvie T P, Jirage K B, Kim J B, Knight J R, Lanza J R, Leamon J H, Lee W L, Lefkowitz S M, Lei M, Li J, Lohman K L, Lu H, Makhijani V B, McDade K E, McKenna M P, Myers E W, Nickerson E, Nobile J R, Plant R, Puc B P, Reifler M, Ronan M T, Roth G T, Sarkis G J, Simons J F, Simpson J W, Srinivasan M, Tartaro K R, Tomasz A, Vogt K A, Volkmer G A, Wang S H, Wang Y, Weiner M P, Willoughby D A, Yu P G, Begley R F, Rothberg J M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 2005, 437(7057): 376-380.

[18] Zhou X G, Ren L F, Li Y T, Zhang M, Yu Y D, Yu J. The next-generation sequencing technology: a technology review and future perspective. Science China Life Sciences, 2010, 53(1): 44-57.

[19] Escalante A E, Barbolla L J, Ramírez-Barahona S, Eguiarte L E. The study of biodiversity in the era of massive sequencing. Revista Mexicana de Biodiversidad, 2014, 85(4): 1249-1264.

[20] Flusberg B A, Webster D R, Lee J H, Travers K J, Olivares E C, Clark T A, Korlach J, Turner S W. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. Nature Methods, 2010, 7(6): 461-465.

[21] Ivanov A P, Instuli E, McGilvery C M, Baldwin G, McComb D W, Albrecht T, Edel J B. DNA tunneling detector embedded in a nanopore. Nano Letters, 2011, 11(1): 279-285.

[22] 朱艳慧, 贺树香, 王晓春, 胡朝晖. 通往个性化医疗的新一代测序技术: Ion Torrent. 生物技术通讯, 2013, 24(4): 587-591.

[23] Del Chierico F, Ancora M, Marcacci M, Cammà C, Putignani L, Conti S. Choice of next-generation sequencing pipelines//Mengoni A, Galardini M, Fondi M, eds. Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. New York: Springer, 2015: 31-47.

[24] 张得芳, 马秋月, 尹佟明, 夏涛. 第三代测序技术及其应用. 中国生物工程杂志, 2013, 33(5): 125-131.

[25] Symondson W O C. Molecular identification of prey in predator diets. Molecular Ecology, 2002, 11(4): 627-641.

[26] 窦永静, 常亮, 吴东辉. 土壤动物食物网研究方法. 生态学杂志, 2015, 34(1): 247-255.

[27] Kress W J, García-Robledo C, Uriarte M, Erickson D L. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. Trends in Ecology & Evolution, 2015, 30(1): 25-35.

[28] Symondson W O C, Harwood J D. Special issue on molecular detection of trophic interactions: unpicking the tangled bank. Molecular Ecology, 2014, 23(15): 3601-3604.

[29] Wirta H K, Vesterinen E J, Hambäck P A, Weingartner E, Rasmussen C, Reneerkens J, Schmidt N M, Gilg O, Roslin T. Exposing the structure of an Arctic food web. Ecology and Evolution, 2015, 5(17): 3842-3856.

[30] Kartzinel T R, Chen P A, Coverdale T C, Erickson D L, Kress W J, Kuzmina M L, Rubenstein D I, Wang W, Pringle R M. DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(26): 8019-8024.

[31] Ford M J, Hempelmann J, Hanson M B, Ayres K L, Baird R W, Emmons C K, Lundin J I, Schorr G S, Wasser S K, Park L K. Estimation of a killer whale (*Orcinus orca*) population's diet using sequencing analysis of DNA from feces. PLoS One, 2016, 11(1): e0144956.

[32] Hamady M, Walker J J, Harris J K, Gold N J, Knight R. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. Nature Methods, 2008, 5(3): 235-237.

[33] Deagle B E, Kirkwood R, Jarman S N. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. Molecular Ecology, 2009, 18(9): 2022-2038.

[34] Brown D S, Burger R, Cole N, Vencatasamy D, Clare E L, Montazam A, Symondson W O C. Dietary competition between the alien Asian Musk Shrew (*Suncus murinus*) and a re-introduced population of Telfair's Skink (*Leiolopisma telfairii*). Molecular Ecology, 2014, 23(15): 3695-3705.

[35] Clare E L, Symondson W O C, Fenton M B. An inordinate fondness for beetles? Variation in seasonal dietary preferences of night-roosting big brown bats (*Eptesicus fuscus*). Molecular Ecology, 2014, 23(15): 3633-3647.

[36] Ando H, Setsuko S, Horikoshi K, Suzuki H, Umehara S, Inoue-Murayama M, Isagi Y. Diet analysis by next-generation sequencing indicates the frequent consumption of introduced plants by the critically endangered red-headed wood pigeon (*Columba janthina nitens*) in oceanic island habitats. Ecology and Evolution, 2013, 3(12): 4057-4069.

[37] Quéméré E, Hibert F, Miquel C, Lhuillier E, Rasolondraibe E, Champeau J, Rabarivola C, Nusbaumer L, Chatelain C, Gautier L, Ranirison P, Crouau-Roy B, Taberlet P, Chikhi L. A DNA metabarcoding study of a primate dietary diversity and plasticity across its entire fragmented range. PLoS One, 2013, 8(3): e58971.

[38] Boyer S, Wratten S D, Holyoake A, Abdelkrim J, Cruickshank R H. Using next-generation sequencing to analyse the diet of a highly endangered land snail (*Powelliphanta augusta*) feeding on endemic earthworms. PLoS One, 2013, 8(9): e75962.

[39] Piñol J, San Andrés V, Clare E L, Mir G, Symondson W O C. A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: the use of next-generation sequencing with no blocking probes. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(1): 18-26.

[40] Mollot G, Duyck P F, Lefeuvre P, Lescourret F, Martin J F, Piry S, Canard E, Tixier P. Cover cropping alters the diet of arthropods in a banana plantation: a metabarcoding approach. PLoS One, 2014, 9(4): e93740.

[41] Valentini A, Miquel C, Nawaz M A, Bellemain E, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, Swenson J E, Taberlet P. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trn*L approach. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(1): 51-60.

[42] Kajtoch Ł. A DNA metabarcoding study of a polyphagous beetle dietary diversity: the utility of barcodes and sequencing techniques. Folia Biologica (Kraków), 2014, 62(3): 223-234.

[43] McClenaghan B, Gibson J F, Shokralla S, Hajibabaei M. Discrimination of grasshopper (Orthoptera: Acrididae) diet and niche overlap using next-generation sequencing of gut contents. Ecology and Evolution, 2015, 5(15): 3046-3055.

[44] 李文哲. 植物叶绿体 DNA 与线粒体 DNA 的遗传变异. 细胞生物学杂志, 1988, 10(1): 5-10.

[45] 张尚宏. 动物与植物线粒体基因组结构的差异——两种进化途径. 动物学研究, 1995, 16(2): 132-145.

[46] Xiao J H, Wang N X, Murphy R W, Cook J, Jia L Y, Huang D W. *Wolbachia* infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp. Evolution, 2012, 66(6): 1907-1916.

[47] 娄文静. 榕小蜂线粒体异质性研究[M]. 保定: 河北大学, 2013.

[48] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, deWaard J R. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.

[49] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(S1): S96-S99.

[50] Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Resources, 2007, 7(3): 355-364.

[51] 赵广宇, 李虎, 杨海林, 彩万志. DNA 条形码技术在昆虫学中的应用. 植物保护学报, 2014, 41(2): 129-141.

[52] Li D Z, Gao L M, Li H T, Wang H, Ge X J, Liu J Q, Chen Z D, Zhou S L, Chen S L, Yang J B, Fu C X, Zeng C X, Yan H F, Zhu Y J, Sun Y S, Chen S Y, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan G W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(49): 19641-19646.

[53] Yang J B, Wang Y P, Möller M, Gao L M, Wu D. Applying plant DNA barcodes to identify species of *Parnassia* (Parnassiaceae). Molecular Ecology Resources, 2012, 12(2): 267-275.

[54] Clare L J, Soubrier J, Weyrich L S, Cooper A. Environmental metabarcodes for insects: *in silico* PCR reveals potential for taxonomic bias. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(6): 1160-1170.

[55] Brandon-Mong G J, Gan H M, Sing K W, Lee P S, Lim P E, Wilson J J. DNA metabarcoding of insects and allies: an evaluation of primers and pipelines. Bulletin of Entomological Research, 2015, 105(6): 717-727.

[56] Gomez-Polo P, Alomar O, Castañé C, Lundgren J G, Piñol J, Agustí N. Molecular assessment of predation by hoverflies (Diptera: Syrphidae) in Mediterranean lettuce crops. Pest Management Science, 2015, 71(9): 1219-1227.

[57] Gomez-Polo P, Alomar O, Castañé C, Aznar-Fernández T, Lundgren J G, Piñol J, Agustí N. Understanding trophic interactions of *Orius* spp. (Hemiptera: Anthocoridae) in lettuce crops by molecular methods. Pest Management Science, 2016, 72(2): 272-279.

[58] 唐敏, 伊廷双, 王欣, 谭美华, 周欣. Metabarcoding 技术在植物鉴定和多样性研究中的应用. 植物分类与资源学报, 2013, 35(6): 769-773.

[59] Meier R, Wong W, Srivathsan A, Foo M. $1 DNA barcodes for reconstructing complex phenomes and finding rare species in specimen-rich samples. Cladistics, 2016, 32(1): 100-110.

[60] Blanckenhorn W U, Rohner P T, Bernasconi M V, Haugstetter J, Buser A. Is qualitative and quantitative metabarcoding of dung fauna biodiversity feasible? Environmental Toxicology and Chemistry, 2015, doi: 10.1002/etc.3275.

[61] Sheppard S K, Harwood J D. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. Functional Ecology, 2005, 19(5): 751-762.

[62] Wang G H, Wang X Q, Qiao F, Zhu Z R, Cheng J A. Development and preliminary application of a triplex real-time polymerase chain reaction assay for evaluating predation on three planthoppers in a rice ecosystem. Molecular Ecology Resources, 2013, 13(5): 811-819.

[63] Deagle B E, Jarman S N, Coissac E, Pompanon F, Taberlet P. DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. Biology Letters, 2014, 10(9): 20140562.

[64] Clare E L. Molecular detection of trophic interactions: emerging trends, distinct advantages, significant considerations and conservation applications. Evolutionary Applications, 2014, 7(9): 1144-1157.

[65] Gibson J, Shokralla S, Porter T M, King I, van Konynenburg S, Janzen D H, Hallwachs W, Hajibabaei M. Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasystematics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(22): 8007-8012.

[66] Hebert P D N, deWaard J R, Landry J F. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. Biology Letters, 2010, 6(3): 359-362.

[67] Quince C, Lanzen A, Davenport R J, Turnbaugh P J. Removing noise from pyrosequenced amplicons. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 38.

[68] Zhou X, Li Y Y, Liu S L, Yang Q, Su X, Zhou L L, Tang M, Fu R B, Li J G, Huang Q F. Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification. GigaScience, 2013, 2(1): 4.

[69] Tang M, Tan M H, Meng G L, Yang S Z, Su X, Liu S L, Song W H, Li Y Y, Wu Q, Zhang A B, Zhou X. Multiplex sequencing of pooled mitochondrial genomes—a crucial step toward biodiversity analysis using mito-metagenomics. Nucleic Acids Research, 2014, 42(22): e166.

[70] Linard B, Crampton-Platt A, Gillett C P D T, Timmermans M J T N, Vogler A P. Metagenome skimming of insect specimen pools: potential for comparative genomics. Genome Biology and Evolution, 2015, 7(6): 1474-1489.

[71] Andújar C, Arribas P, Ruzicka F, Crampton-Platt A, Timmermans M J T N, Vogler A P. Phylogenetic community ecology of soil biodiversity using mitochondrial metagenomics. Molecular Ecology, 2015, 24(14): 3603-3617.

[72] Liu S L, Wang X, Xie L, Tan M H, Li Z Y, Su X, Zhang H, Misof B, Kjer K M, Tang M, Niehuis O, Jiang H, Zhou X. Mitochondrial capture enriches mito-DNA 100 fold, enabling PCR-free mitogenomics biodiversity analysis. Molecular Ecology Resources, 2016, 16(2): 470-479.

[73] Hawkins M T R, Hofman C A, Callicrate T, McDonough M M, Tsuchiya M T N, Gutiérrez E E, Helgen K M, Maldonado J E. In-solution hybridization for mammalian mitogenome enrichment: pros, cons and challenges associated with multiplexing degraded DNA. Molecular Ecology Resources, 2015, doi: 10.1111/1755-0998.12448.